Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):535-543

Effect of Organic Solvents and Osmolytes on the Activity and Stability of the Protease Purified from Ficus johannis

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Afsharnezhad M.[1] *MSc,*
Shahangian S.S.*[1] *PhD,*
Salehi M.[2] *PhD,*
Sariri R.[1] *PhD*

How to cite this article
Afsharnezhad M, Shahangian S.S, Salehi M, Sariri R. Effect of Organic Solvents and Osmolytes on the Activity and Stability of the Protease Purified from Ficus johannis. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):535-543.

[1]Biology Department, Sciences Faculty, University of Guilan, Rasht, Iran
[2]Biology Department, Science & Engineering Faculty, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

Correspondence
Address: Sciences Faculty, University of Guilan, Namjoo Street, Rasht, Iran.
Postal Code: 4193833697
Phone: +98 (13) 3333647
Fax: +98 (13) 3333647
shahangian@guilan.ac.ir

Article History
Received: October 16, 2018
Accepted: May 18, 2019
ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

The use of enzymes in organic solvents represents an important area of industrial and biotechnological development. However, organic solvents often cause protein denaturation, thereby reducing the activity and stability of enzymes. Use of stabilizing additives, protein engineering and chemical modification of enzymes are common strategies to overcome this problem. In this study, a cysteine protease from the latex of Ficus johannis was purified and the activity and stability of the protease were investigated in the presence of different organic solvents. The effect of trehalose, sorbitol, and sucrose on the enzyme activity was also studied in the presence of organic solvents. The results showed that the enzyme activity was elevated in the presence of low concentrations of organic solvents increased, while it was decreased with increasing concentration of organic solvents. However, the enzyme still retained 60% of its activity at 30% organic solvent concentration. The enzyme was considerably stable in the presence of organic solvents, maintaining almost 90% of its stability in the presence of 50% of all solvents. As stabilizing additives, sugars enhanced the catalytic activity and stability of the enzyme, and trehalose was the most effective sugar. The easy purification procedure and considerable activity and stability of the protease in the presence of organic solvents could suggest this enzyme as a good candidate for peptide synthesis industry.

Keywords Ficus johannis Protease; Stability; Organic Chemicals; Additives

CITATION LINKS

[1] The effects of organic solvent/water mixtures on the structure ... [2] Biocatalysis and enzymes in organic ... [3] Organic solvent-tolerant ... [4] Effect of organic solvents on stability and activity of ... [5] On protein denaturation in aqueous- organic mixtures but not in ... [6] Strategies for stabilization of enzymes in ... [7] Organic co-solvents affect activity, stability ... [8] Stabilization of protein structure by ... [9] Increased thermal stability of proteins in ... [10] Modulation of the thermodynamic ... [11] A molecular mechanism for osmolyte-induced protein ... [12] Effects of sucrose on the internal dynamics of ... [13] A cut above the rest: The regulatory function of plant ... [14] A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant Wrightia tinctoria ... [15] Molecular and biotechnological aspects of microbial ... [16] Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial ... [17] A novel milk-clotting cysteine protease from Ficus johannis: Purification and ... [18] Religiosin B, a milk-clotting serine protease from Ficus ... [19] Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of ... [20] A novel organic solvent-and detergent-stable ... [21] Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from Bacillus ... [22] Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity ... [23] Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from Ficus ... [24] Characterization of solvent stable extracellular protease ... [25] The change in hydrogen bond strength accompanying ... [26] Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from Rhus ... [27] The effect of water on enzyme action in organic ... [28] EFactors enhancing protein ... [29] Organic solvents strip water off enzymes. Biotechnol ... [30] Stability studies of protease from Bacillus ... [31] Isolation and screening of an extracellular ... [32] Inactivation of enzymes by organic solvents: New ... [33] Evaluation of protease stability from Pseudomonas aeroginosa ... [34] Purification and characterization of organic ... [35] Effect of organic solvents on the activity and ... [36] Effect of exchange of amino acid residues ... [37] Interactions of formulation excipients ... [38] Enzyme stability and stabilization-aqueous ... [39] Effect of polyols on the native structure of ... [40] Practical insights on enzyme ... [41] Stabilizing effect of various polyols on the native and the ... [42] Study of the stability of uricase from Aspergillus ... [43] Comparative investigation of individual and combinational effects of ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

اثر حلال‌های آلی و اسمولیت‌ها بر فعالیت و پایداری پروتئاز خالص‌شده از گیاه *فیکوس یوهانیس*

مسلم افشارنژاد MSc
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
سیده‌شیرین شاهنگیان* PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
محمود صالحی PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و مهندسی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
ریحانه سریری PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

چکیده
به‌کارگیری آنزیم‌ها در حلال‌های آلی از لحاظ صنعتی و بیوتکنولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. اما حلال‌های آلی با تاثیر بر ساختار پروتئین‌ها و واسرشتگی آنها باعث کاهش فعالیت و پایداری آنزیم‌ها می‌شوند. برای رفع این مشکل می‌توان از روش‌های پایدارسازی پروتئین‌ها نظیر مهندسی پروتئین، تغییرات شیمیایی و به‌کاربردن افزودنی‌ها استفاده نمود. در این مطالعه سیستئین‌پروتئازی از شیرابه گیاه *فیکوس یوهانیس* تخلیص شد و فعالیت و پایداری پروتئاز در حضور حلال‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. اثر ترهالوز، سوربیتول و ساکارز نیز بر فعالیت آنزیم در حضور حلال‌ها مطالعه شد. نتایج نشان داد حلال‌های آلی در غلظت‌های پایین باعث افزایش فعالیت آنزیم شده ولی با افزایش غلظت حلال‌ها فعالیت آنزیمی کاهش می‌یابد. اگرچه تا غلظت ۳۰% حلال‌ها، همچنان بیش از ۶۰% فعالیت آنزیم حفظ شده است. نتایج مطالعات پایداری پروتئاز نشان‌دهنده پایداری قابل توجه آنزیم نسبت به حلال‌های آلی است، به‌طوری که در حضور ۵۰% تمامی حلال‌ها، آنزیم همچنان ۹۰% پایداری‌اش را حفظ کرده است. بررسی اثر افزودنی‌ها نشان داد قندها موجب بهبود فعالیت آنزیم می‌شوند و بیشترین اثر حفظ فعالیت آنزیم مربوط به ترهالوز بود. با توجه به روش تخلیص آسان و فعالیت و پایداری قابل توجه پروتئاز مورد مطالعه در حضور حلال‌ها، این آنزیم برای استفاده در صنایع مختلف به‌خصوص سنتز پپتید پیشنهاد می‌شود.

کلیدواژه‌ها: پروتئاز فیکوس یوهانیس، پایداری، حلال‌های آلی، افزودنی‌ها

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۸
*نویسنده مسئول: shahangian@guilan.ac.ir

مقدمه

آنزیم‌ها در حضور حلال‌های آلی خواص و ویژگی‌هایی پیدا می‌کنند که هرگز در محیط‌های آبی بروز نمی‌کنند. بنابراین مطالعات بسیاری در زمینه تاثیر حلال‌های آلی بر فعالیت و پایداری آنزیم‌ها صورت گرفته است[1, 2]. استفاده از آنزیم‌ها در حلال‌های آلی مزایایی همچون افزایش حلالیت سوبستراهای آب‌گریز، برگشت تعادل ترمودینامیکی واکنش‌های هیدرولیزی، حذف واکنش‌های جانبی وابسته به آب، افزایش پایداری دمایی به‌دلیل کاهش انعطاف‌پذیری ساختاری، کاهش رشد میکروبی، بازیابی و استفاده مجدد از آنزیم و تسهیل استفاده از سوبستراهای حساس به رطوبت دارد[3]. با این حال مهم‌ترین محدودیت استفاده از آنزیم‌ها در حضور حلال‌های آلی کاهش فعالیت و پایداری آنها است. حلال‌های آلی با جداکردن مولکول‌های آب از اطراف پروتئین باعث تخریب ساختار سه‌بعدی یا واسرشته‌شدن آنها می‌شوند[4, 5]. بنابراین استفاده از آنزیم‌ها در محیط‌های حاوی حلال‌های آلی همواره با چالش‌های بزرگی روبه‌رو بوده است. برای استفاده از آنزیم‌ها در صنعت باید پایداری آنزیم را در فرآیندهای صنعتی که در شرایط فیزیکی و شیمیایی خاصی انجام می‌شوند، بهبود بخشید زیرا ممکن است طی این فرآیندها ساختار آنزیم واسرشته‌شده و فعالیت کاتالیتیک خود را از دست بدهد. روش‌های مختلفی به‌منظور بهبود فعالیت و پایداری آنزیم‌ها در حضور حلال‌های آلی وجود دارد. این روش‌ها شامل استفاده از افزودنی‌ها، تثبیت آنزیم روی بسترهای محافظ غیرمحلول، تغییرات شیمیایی آنزیم‌ها، تغییرات فیزیکی آنزیم‌ها با لیپیدها و سورفکتانت‌ها، به دام‌اندازی آنزیم‌ها در میسل‌های برگشت‌پذیر و مهندسی پروتئین است[6, 7]. از میان روش‌های ذکرشده به‌منظور پایدارسازی آنزیم‌ها، استفاده از افزودنی‌ها از روش‌های مفید، ساده و زودبازده است[8, 9]. این مواد معمولاً از طریق آب‌پوشی ترجیحی موجب پایدارشدن پروتئین‌ها می‌شوند. معمولاً برای پایدارسازی آنزیم‌ها از افزودنی‌هایی مانند سوربیتول، ساکارز و ترهالوز استفاده می‌شود[8, 10-12]. از آنجایی که آنزیم‌های طبیعی که ذاتاً مقاوم به حلال‌های آلی هستند بدون نیاز به استفاده از روش‌های پایدارسازی نامبرده می‌توانند مورد استفاده صنعتی قرار بگیرند، از لحاظ صنعتی و بیوتکنولوژیکی بسیار مورد توجه هستند. پروتئازها به‌عنوان آنزیم‌های چندکاره کاربردهای گسترده و متنوعی در حوزه‌های مختلف همچون سنتز پپتید، صنایع غذایی، دارویی و شوینده دارند[13]. به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های آنزیم‌های صنعتی، پروتئازها ۶۰% کل بازار جهانی فروش آنزیم را به خود اختصاص داده‌اند[14]. پروتئازها در محیط‌های آبی هیدرولیز پیوندهای پپتیدی را کاتالیز می‌کنند اما در محیط‌های غیرآبی و در حضور حلال‌های آلی واکنش عکس را انجام داده و باعث تشکیل پیوندهای پپتیدی می‌شوند[15, 16]. از این رو مطالعات بسیاری برای بررسی پایداری و پایدارسازی پروتئازها در حلال‌های آلی صورت گرفته است. نظر به این که پروتئازهای گیاهی در طیف وسیعی از pH، دما و همچنین در حضور سورفکتانت‌ها، حلال‌های آلی، عوامل دناتوره‌کننده و یون‌های فلزی دارای فعالیت هستند، توجه زیادی به این آنزیم‌ها معطوف شده است[17, 18]. در مطالعه حاضر ابتدا سیستئین‌پروتئاز موجود در شیرابه گیاه *فیکوس یوهانیس* (*Ficus johannis*) با استفاده از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی تخلیص شد. اثر حلال‌های آلی مختلف بر فعالیت و پایداری پروتئاز خالص ارزیابی شد. سپس اثر ساکارز، ترهالوز و سوربیتول، به‌عنوان افزودنی‌های معمول، بر فعالیت آنزیم در حضور حلال‌ها مطالعه و درنهایت پایداری حرارتی و غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم در دمای ۶۵°C در حضور افزودنی‌ها بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: اتانول، متانول، دی‌متیل‌فرمامید (DMF)، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، استونیتریل، اتیلن‌گلیکول، سوکروز، سوربیتول، ترهالوز، آلبومین سرم گاوی (BSA)، تری‌کلرواستیک‌اسید، آکریل‌آمید، بیس‌آکریل‌آمید و کازئین (سیگماآلدریچ؛ ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند. رزین کروماتوگرافی تعویض کاتیونی UNOsphere™ S و کوماسی‌بریلینت‌بلو R-250 (بیورد؛ ایالات متحده آمریکا) و سایر مواد شیمیایی در درجه آنالیتیکال تهیه شدند.

استخراج آنزیم: ابتدا ۵گرم میوه نارس گیاه *فیکوس یوهانیس* با مخلوط‌کن همراه با اضافه‌کردن ۵۰میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۰میلی‌مولار (با pH برابر ۷) کاملاً خرد و یکنواخت و به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۴°C هموژنیزه شد. سپس مخلوط حاصل به‌مدت ۲۰دقیقه در دمای ۴°C در ۱۴۰۰۰×g سانتریفیوژ و پس از صاف‌کردن مجدد محلول فوقانی، عصاره به‌دست‌آمده تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

کروماتوگرافی تعویض کاتیونی: به‌منظور تخلیص آنزیم، محلول رویی حاصل از مرحله قبل به ستون تعویض کاتیونی UNOsphere™S که توسط بافر فسفات ۲۰میلی‌مولار (با pH برابر ۷) به تعادل رسیده بود، منتقل شد. به‌منظور خارج‌کردن پروتئین‌های متصل‌نشده به رزین، ستون با استفاده از بافر متعادل‌سازی شست‌وشو داده شد. سپس پروتئین‌های متصل‌شده به رزین در چند مرحله به روش پله‌ای با استفاده از غلظت‌های ۰/۲- صفر، ۰/۳-۰/۲، ۰/۴-۰/۳، ۰/۶-۰/۴ و ۰/۸-۰/۶مولار سدیم‌کلرید در بافر شست‌وشو از ستون جدا شدند. محتوای پروتئینی فرکشن‌های خارج‌شده در طول موج ۲۸۰نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت پروتئازی با استفاده از کازئین ۱% به‌عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور نمک‌زدایی فرکشن‌های دارای فعالیت بالا، دیالیز علیه بافر فسفات ۲۰میلی‌مولار صورت گرفت. نمونه آنزیمی خالص توسط SDS-PAGE تحت شرایط احیایی آنالیز شد[19].

تعیین فعالیت پروتئازی: برای تعیین فعالیت پروتئازی، ۲۲۵میکرولیتر سوبسترای کازئین ۱% تهیه‌شده در بافر فسفات ۵۰میلی‌مولار (با میزان pH برابر ۷) با ۲۵میکرولیتر آنزیم خالص مخلوط شد. بعد از گذشت ۲۰دقیقه انکوباسیون در دمای ۵۰°C، واکنش با اضافه‌کردن ۲۵۰میکرولیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰% (وزنی/حجمی) متوقف شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۱۰دقیقه روی یخ انکوبه شد. بعد از سانتریفیوژ نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰×g به‌مدت ۱۰دقیقه، جذب محلول رویی در ۲۸۰نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-Visible مدل Pharmacia Biothch ultrospect 3000 (Labequip؛ انگلستان) اندازه‌گیری شد. نمونه کنترل نیز با اضافه‌کردن تری‌کلرواستیک‌اسید به سوبسترا قبل از اضافه‌کردن آنزیم تهیه شد. واحد فعالیت آنزیمی به‌صورت مقدار آنزیمی که موجب آزادشدن یک‌میکرومول تیروزین از سوبسترا طی یک‌دقیقه می‌شود، تعریف شد.

اثر حلال‌های آلی بر فعالیت پروتئاز: برای ارزیابی فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های آلی، غلظت‌های مختلفی (۱۰ تا ۵۰% حجمی/حجمی) از حلال‌های آلی متانول، اتانول، دی‌متیل‌فرمامید (DMF)، دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO)، استونیتریل و اتیلن‌گلیکول تهیه و فعالیت آنزیم در حضور هر کدام از این حلال‌ها ارزیابی شد. با درنظرگرفتن فعالیت آنزیم در محیط واکنش بدون حلال به‌عنوان کنترل (فعالیت ۱۰۰%)، درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم محاسبه شد[20].

بررسی پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی: به‌منظور بررسی اثر حلال‌های آلی بر پایداری آنزیم، پروتئاز خالص در حضور غلظت ۵۰% (حجمی/حجمی) حلال‌های آلی به‌مدت ۲ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس فعالیت آنزیمی مطابق روش ذکرشده در بخش ۲-۴ اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی در زمان صفر به‌عنوان کنترل (۱۰۰%) در نظر گرفته و فعالیت در حضور هر یک از حلال‌های آلی در مقایسه با آن محاسبه و گزارش شد[21].

بررسی اثر حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیمی در حضور افزودنی‌ها: بدین‌منظور فعالیت آنزیمی در غلظت ۵۰% (حجمی/حجمی) از حلال‌های آلی در حضور غلظت ۲۰% از ترهالوز، سوربیتول و ساکارز اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم با درنظرگرفتن فعالیت آنزیم در محیط واکنش بدون افزودنی به‌عنوان کنترل (فعالیت ۱۰۰%) محاسبه شد[22].

اثر افزودنی‌ها بر پایداری حرارتی: پایداری حرارتی آنزیم خالص با انکوبه‌کردن آنزیم در دمای ۶۵°C در حضور غلظت‌های مختلف (۵ تا ۳۰%) ساکاروز، ترهالوز و سوربیتول برای مدت‌زمان ۱۵دقیقه صورت گرفت. بعد از مدت‌زمان مذکور آنزیم بلافاصله روی یخ انکوبه و فعالیت باقی‌مانده در دمای ۵۰°C با استفاده از کازئین ۱% به‌عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم در غیاب افزودنی‌ها به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. همچنین غیرفعال‌سازی حرارتی آنزیم در دمای ۶۵°C در فواصل زمانی مختلف در حضور غلظت ۲۰% از قندها مورد بررسی قرار گرفت[23].

نتایج و بحث

تخلیص پروتئاز: در این مطالعه سیستئین‌پروتئاز جدیدی از شیرابه گیاه *فیکوس یوهانیس* با استفاده از روش ساده و یک مرحله‌ای کروماتوگرافی تبادل کاتیونی تخلیص شد. پروتئین‌های اتصال‌نیافته به رزین با استفاده از بافر تعادل‌سازی خارج شدند. همان‌طور که در نمودار ۱- A نشان داده شده در این مرحله آنزیم پروتئاز از ستون خارج نشده است که نشان‌دهنده اتصال قوی آنزیم به رزین است. سپس پروتئین‌های متصل‌شده به ستون طی ۵ مرحله در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید به‌صورت پله‌ای از ستون شسته شدند. جذب فرکشن‌های خارج‌شده از ستون در طول موج ۲۸۰نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه‌های دارای جذب بالا به‌منظور سنجش فعالیت پروتئاز با استفاده از کازئین ۱% به‌عنوان سوبسترا انتخاب شدند. فرکشن‌های جداشده در غلظت ۰/۲-صفرمولار

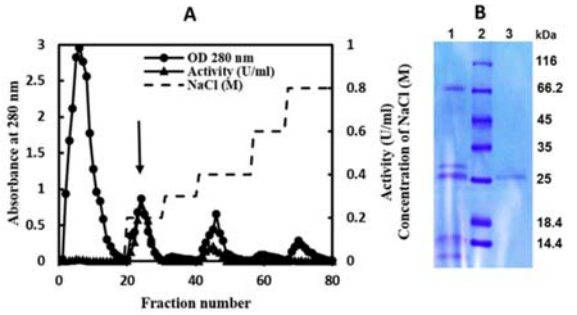
www.SID.ir

Archive of SID

سدیم‌کلرید دارای بالاترین فعالیت آنزیمی هستند (نمودار ۱- A، نشان داده‌شده با فلش). پروتئین‌های حاصل از این مرحله دیالیز شده و سپس به‌منظور بررسی خلوص تحت الکتروفورز قرار گرفتند که نتایج حاکی از خلوص بالای آنزیم است (نمودار ۱- B). خلاصه‌ای از مراحل خالص‌سازی و بازیافت فعالیت آنزیمی در جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشاهده می‌شود سیستئین‌پروتئاز مورد نظر به‌آسانی و طی یک مرحله خالص‌سازی، به‌طور قابل قبولی خالص شد (۵/۶۴ مرتبه خالص‌سازی). همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود میزان بازیافت فعالیت حدود ٤١/٥٤% است که حاکی از بازیابی مناسب فعالیت آنزیمی است. فعالیت ویژه پروتئاز خالص‌شده ٦/٨٣واحد بین‌المللی/میلی‌گرم پروتئین به دست آمد که به‌طور واضحی در مقایسه با عصاره خام (۱/۲۱واحد بین‌المللی/میلی‌گرم پروتئین) افزایش یافته است. میزان pH و دمای بهینه پروتئاز به‌ترتیب ۶/۵ و ۵۰°C است. دسترسی آسان به مقدار زیاد گیاه، خارج سلولی بودن آنزیم پروتئاز به همراه خالص‌سازی ساده آن، حصول مقادیر زیادی از آنزیم خالص را ممکن می‌سازد که به‌عنوان مزیتی برای کاربردهای صنعتی و بیوتکنولوژی پروتئاز مورد مطالعه مطرح است (نمودار ۱، جدول ۱).

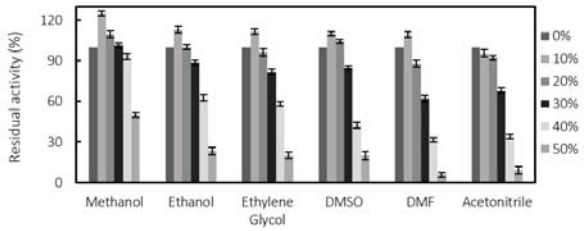
جدول ۱) مراحل خالص‌سازی سیستئین پروتئاز گیاه *فیکوس یوهانیس*

مراحل خالص‌سازی	پروتئین کل (میلی‌گرم)	بازیافت پروتئین (%)	فعالیت کل (واحد بین‌المللی)	بازیافت فعالیت (%)	فعالیت ویژه (واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم پروتئین)	مرتبه خالص‌سازی
عصاره خام	۱۹/۹٦	۱۰۰	۲۴/۳۴	۱۰۰	۱/۲۱	۱
کروماتوگرافی تعویض کاتیونی	۱/۴۸	۷/۴۴	۱۰/۱۱	۴۱/۵۴	۶/۸۳	۵/۶۴



نمودار ۱) (A) کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی؛ ستون کروماتوگرافی UNOsphere™ S با استفاده از بافر فسفات ۲۰میلی‌مولار (با میزان pH برابر ۷) متعادل‌سازی شد. پروتئین‌های متصل‌شده به ستون در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید به‌صورت پله‌ای از ستون شسته شدند. فرکشن‌های جداشده در غلظت ۰/۲-صفرمولار سدیم‌کلرید (نشان داده‌شده با فلش) دارای بالاترین فعالیت آنزیمی بودند. (B) نتایج SDS-PAGE پروتئاز خالص‌شده؛ ۱) عصاره خام، ۲) مارکر پروتئینی، ۳) پروتئاز خالص‌شده

اثر حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیم: استفاده از پروتئازها در حلال‌های آلی در صنایع مختلفی مانند غذا، دارو، لوازم آرایشی و بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته است. محیط‌های غیرآبی یا آبی/آلی ویژگی سوبسترایی پروتئازها را تغییر داده و تعادل واکنش را به سمت سنتز ترکیبات جدید هدایت می‌کند. با این حال، مهم‌ترین محدودیت استفاده از پروتئازها در حلال‌های آلی کاهش فعالیت آنها در مقایسه با محیط آبی است[24]. در صورتی که پروتئاز مورد نظر در حلال‌های آلی پایدار باشد و فعالیت بالایی از خود نشان دهد، می‌تواند بدون نیاز به روش‌های پایدارسازی در صنایع متنوعی از جمله صنعت سنتز پپتید مورد استفاده قرار گیرد. فعالیت پروتئاز خالص‌شده در حضور درصدهای مختلف حلال‌های آلی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور سوبسترای کازئین ۱% حاوی غلظت‌های نهایی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰% (حجمی/حجمی) از حلال‌ها تهیه و فعالیت آنزیمی در حضور این درصدها سنجیده شد که نتایج آن در نمودار ۲ نشان داده شده است. چنان چه در نمودار مشاهده می‌شود فعالیت آنزیم در حضور تمامی حلال‌های آلی بسیار بالا است و حتی در حضور غلظت ۱۰% حلال‌ها، به استثنای استونیتریل، فعالیت پروتئولیتیک افزایش یافته است. در غلظت ۲۰% حلال‌ها فعالیت آنزیم به‌طور کامل حفظ شده است. فعالیت آنزیمی در غلظت ۳۰% اغلب حلال‌ها کاهش یافت، به‌طوری که در حضور اتانول، اتیلن‌گلیکول و DMSO به ۸۰% و در حضور استونیتریل و DMF به ۶۰% کاهش پیدا کرد. فعالیت در حضور متانول ۳۰% همچنان به‌طور کامل حفظ شد. در غلظت‌های بالاتر فعالیت آنزیمی به‌شدت کاهش می‌یابد. اگرچه در غلظت مشابه حلال متانول آنزیم رفتار متفاوتی نشان داد و بیش از ۹۰% فعالیت آنزیم حفظ شد (نمودار ۲).



نمودار ۲) فعالیت پروتئاز خالص‌شده در حضور غلظت‌های مختلف حلال‌های آلی؛ برای این منظور ابتدا سوبسترای کازئین ۱% حاوی غلظت نهایی ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰% (حجمی/حجمی) از حلال‌های آلی مختلف تهیه و سپس فعالیت آنزیمی در حضور آنها اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم در عدم حضور حلال به‌عنوان ۱۰۰% در نظر گرفته شد و فعالیت باقی‌مانده در حضور هر یک از حلال‌های آلی به‌عنوان جزئی از این مقدار محاسبه و گزارش شد.

افزایش فعالیت در غلظت‌های پایین حلال‌ها دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد. *شان* و *هرسلیگ* نشان دادند که حضور غلظت‌های پایین DMSO چگالی بار را روی اتم‌های دهنده یا گیرنده پیوند هیدروژنی افزایش می‌دهد که منجر به قوی‌ترشدن پیوندهای هیدروژنی بین آنزیم تریوزفسفات‌ایزومراز و سوبسترا می‌شود، به‌طوری که بار طی تبدیل حالت پایه به حالت انتقالی بازآرایی می‌شود و منجر به افزایش سرعت واکنش نسبت به آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID

بدون حلال می‌شود[25]. همچنین حلال‌های آلی در غلظت‌های پایین باعث ایجاد تغییراتی در ساختمان آنزیم‌ها شده که منجر به افزایش میزان در دسترس‌بودن جایگاه فعال آنزیم برای سوبسترا می‌شود. *سیمون* و *کورتون* نشان دادند حلال‌های آلی سبب تغییرات آرایش فضایی آنزیم شده و این تغییرات فعالیت آنزیم را ارتقا دادند یا این که حلال‌های آلی تعادل بین فرم آنزیمی با فعالیت زیاد و آنزیم با فعالیت کمتر را بیشتر به سمت آنزیم فعال‌تر پیش می‌برند[1]. کاهش فعالیت آنزیم در غلظت‌های بالای حلال‌های آلی ممکن است ناشی از کاهش انعطاف‌پذیری ساختار پروتئینی آنزیم‌ها در حلال‌های آلی، پایدارسازی ترمودینامیکی حالت پایه سوبسترا، دناتوره‌شدن و مهار آنزیمی باشد[6]. نوع حلال آلی، میزان آب‌گریزی آن و ممانعت فضایی از جمله عوامل دخیل در نحوه اثرگذاری حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیمی هستند[26]. از سوی دیگر با توجه به نقش برهمکنش‌های غیرکووالان از جمله برهمکنش‌های آب‌گریز، هیدروژنی و واندروالس در حفظ ساختار و عملکرد آنزیم‌ها، تخریب این برهمکنش‌ها در حضور حلال‌های آلی می‌تواند سبب کاهش فعالیت آنزیم می‌شود. همچنین از عوامل مهم و تاثیرگذار بر فعالیت آنزیم‌ها، مولکول‌های آب سطح آنزیم (آب پیوندی) و محتوای آب محیط است[27, 28]. حلال‌های آلی محلول در آب با توجه به تغییر قطبیت محیط سبب تضعیف برهمکنش‌های الکتروستاتیکی قوی میان آمینواسیدهای باردار و آب سطحی آنزیم شده و در نتیجه حذف آب سطحی رخ می‌دهد[29]. بنابراین حلال‌های آلی در درصدهای بالا با جداکردن آب ضروری اطراف پروتئین‌ها می‌توانند موجب واسرشتگی و نهایتاً غیرفعال‌شدن آنها شوند.

اثر حلال‌های آلی بر پایداری آنزیم: از میان کاربردهای متنوعی که پروتئازهای مقاوم به حلال‌های آلی در صنایع مختلف نشان داده‌اند، استفاده از آنها در سنتز پپتید از پیشروترین موارد است. پروتئازهای مختلفی مانند پاپائین، پپسین، ترمولیزین، تریپسین و سایر آنزیم‌های پروتئولیتیک برای سنتز پپتید در حضور حلال‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه سنتز پپتید در موارد معدودی در عدم حضور حلال‌های آلی نیز صورت می‌گیرد اما حضور حلال‌های آلی باعث افزایش بازده سنتز می‌شود، زیرا در حضور این ترکیبات تعادل ترمودینامیکی واکنش عمدتاً به سمت سنتز پیش می‌رود. در صنعت سنتز پپتید برای حصول بازده بالا، پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی بسیار مهم است، زیرا آنزیم‌ها قبل از پایان واکنش سنتز، واسرشته و غیرفعال می‌شوند[30]. به‌منظور مطالعه اثر حلال‌های آلی بر پایداری پروتئاز خالص‌شده، پروتئاز در حلال‌های آلی با غلظت نهایی (حجمی/حجمی) ۵۰% به‌مدت ۲ساعت در دمای اتاق انکوبه و سپس فعالیت باقی‌مانده اندازه‌گیری شد. با توجه به نمودار ۳ مشاهده می‌شود پروتئاز خالص در حضور حلال‌های آلی بسیار پایدار است و فعالیت تقریباً در حضور همه حلال‌ها به‌طور کامل حفظ شده است. مطالعات زیادی درباره پایداری پروتئاز در حلال‌های آلی با درنظرگرفتن خصوصیاتی همچون ثابت دی‌الکتریک، حلالیت در آب و میزان قطبیت صورت گرفته است. پارامتری که میزان قطبیت حلال‌های آلی را به‌طور کمی بیان می‌کند $\log P$ نام دارد که به‌عنوان نسبت غلظت حلال آلی به غلظت فاز آبی تعریف می‌شود. هر چه میزان $\log P$ بزرگ‌تر باشد میزان قطبیت حلال آلی کمتر است. در مطالعه‌ای گزارش شده است که پروتئاز جداشده از *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) سویه K در حلال‌های آلی با $\log P$ بین ۱/۳ تا ۳/۵ مهار می‌شوند و پایداری کمتری دارد و در حلال آلی با $\log P$ بین ۴ تا ۸/۸ در مقایسه با کنترل (بدون حلال آلی) پایدارتر است[31]. در صورتی که در برخی موارد بین پایداری پروتئاز در حلال آلی و قطبیت حلال رابطه‌ای وجود ندارد. *فاتورا* و همکاران گزارش کردند که اثرات غیرفعال‌کنندگی نسبی حلال‌های آلی مختلف بر آنزیم‌ها از هیچ روند مشخصی پیروی نمی‌کند[32]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر *صدرممتاز* و همکاران بیان کردند ارتباط مستقیم و مشخصی بین قطبیت حلال و مقاومت آنزیم الاستاز به حلال مشاهده نمی‌شود[33]. در مورد سیستئین‌پروتئاز استخراج‌شده از *فیکوس یوهانیس* نیز رابطه‌ای بین پایداری و قطبیت حلال‌ها وجود ندارد ($p\geq ۰/۰۵$). می‌توان نتیجه گرفت که پایداری آنزیم در حلال آلی به طبیعت حلال‌های آلی بستگی دارد. جایگزینی برخی مولکول‌های آب در آنزیم با مولکول‌های حلال آلی، در مواردی موجب پایداری ساختار آنزیم می‌شود. مطالعه انجام‌شده توسط *وجینو* نشان داد که حلال‌های آلی محلول در آب مانند اتیلن‌گلیکول، متانول، اتانول و DMSO باعث افزایش پایداری پروتئاز مورد مطالعه آنها می‌شوند، به‌طوری که نیمه‌عمر آنزیم در حضور این حلال‌ها نسبت به محیط آبی افزایش یافت. آنها پیشنهاد کردند که جایگزینی برخی از مولکول‌های آب در آنزیم با حلال‌های آلی، ساختار پروتئین را پایدار می‌کند[34]. نتایج مطالعات دیگر نیز نشان داد حلال‌های آلی تغییرات کونفورماسیونی را القا می‌کنند که منجر به افزایش انعطاف‌پذیری پروتئین شده که برای فعالیت مناسب است[35]. همچنین *وجینو* و همکاران با جایگزینی باقی‌مانده‌های آمینواسیدی از طریق جهش‌زایی هدفمند به این نتیجه رسیدند که باقی‌مانده‌های آمینواسیدی قرارگرفته در سطح مولکول پروتئین نیز نقش مهمی در پایداری آنزیم در حضور حلال‌های آلی دارند[36] (نمودار ۳).

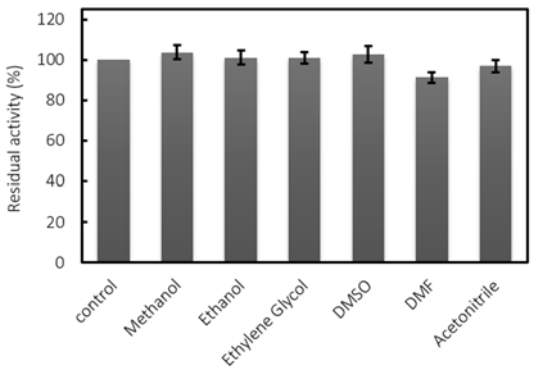
اثر افزودنی‌ها بر فعالیت آنزیمی در حضور حلال‌های آلی: قندها به میزان زیادی در صنعت و آزمایشگاه برای پایدارسازی پروتئین‌ها استفاده می‌شوند[37]. این ترکیبات سبب افزایش پایداری پروتئین‌ها بدون ایجاد تغییرات نامطلوب در ساختار آنها می‌شوند. برای بررسی اثر قندها بر آنزیم مورد مطالعه، تاثیر آنها بر فعالیت در حضور حلال‌ها بررسی شد (نمودار ۴).

نتایج نشان داد فعالیت آنزیم در حضور حلال‌های آلی به شدت کاهش می‌یابد به‌طوری که در حضور DMF، استونیتریل و DMSO به ۱۲% و در حضور اتانول و اتیلن‌گلیکول به ۲۰% کاهش یافت. در حضور متانول، ۵۰% فعالیت آنزیمی حفظ شد. کاهش فعالیت در حضور حلال‌ها احتمالاً ناشی از تخریب ساختار آنزیم است. در حضور

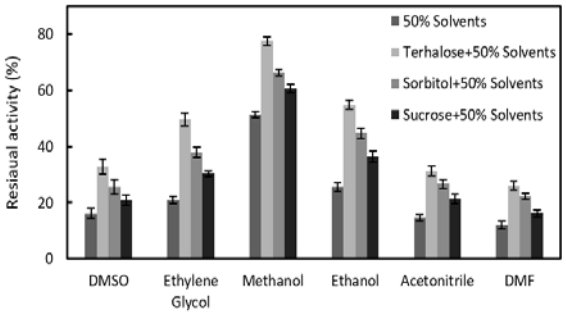
www.SID.ir

Archive of SID

حلال‌های آلی، مولکول‌های حلال تمایل دارند جایگزین مولکول‌های آب موجود در سطح پروتئین شوند که نتیجه آن تغییر فعالیت و ساختار پروتئین خواهد بود که اکثراً منجر به واسرشته‌شدن پروتئین نیز می‌شود[3]. استفاده از قندها موجب افزایش فعالیت آنزیم در همه حلال‌های مورد استفاده شد که بیشترین اثر حفظ فعالیت آنزیم مربوط به ترهالوز بود. در غلظت ۲۰% ترهالوز فعالیت در حضور متانول، اتانول، اتیلن‌گلیکول، استونیتریل، DMF و DMSO به‌ترتیب به ۷۷، ۵۴، ۵۰، ۳۱، ۲۵ و ۳۲% افزایش یافت. (نمودار ۴). قندها با افزایش کشش سطحی محلول و در نتیجه دورشدن ترجیحی از سطح پروتئین باعث افزایش پایداری و فعالیت پروتئین‌ها می‌شوند[37]. مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نیز نشان می‌دهد که قندها باعث کاهش نوسانات ساختار پروتئینی و در نتیجه افزایش پایداری می‌شوند[12]. در حضور قندها به‌دلیل افزایش کشش سطحی و افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب اطراف پروتئین، اتصالات آنها با یکدیگر زیاد شده و بنابراین توانایی حلال‌ها در جداکردن آب ضروری از پروتئین‌ها کاهش می‌یابد. مطالعات زیادی در مورد اثر افزودنی‌ها بر پایداری و فعالیت آنزیم‌ها در حضور حلال‌ها صورت گرفته است. در مطالعات گذشته از ترهالوز، سوربیتول و گلیسرول برای بهبود پایداری ترمولیزین در حضور حلال‌های مختلف استفاده شده است. نتایج بررسی‌ها نشان داد ترهالوز نسبت به دو قند دیگر به‌طور کارآمدتری پایداری ترمولیزین را در حضور DMF و DMSO بهبود بخشیده است، در حالی که گلیسرول و سوربیتول پایدارکننده‌های خوبی در حضور ایزوپروپانول و n- پروپانول هستند. آنها نتیجه‌گیری کردند ترهالوز با جلوگیری از خروج آب ضروری اطراف پروتئین موجب پایداری ترمولیزین می‌شود. در حالی که اثرات حفاظتی سوربیتول و گلیسرول مربوط به رقابت با حلال‌های ایزوپروپانول و n- پروپانول برای اتصال به جایگاه‌های هیدروفوب پروتئین مورد مطالعه است[22].



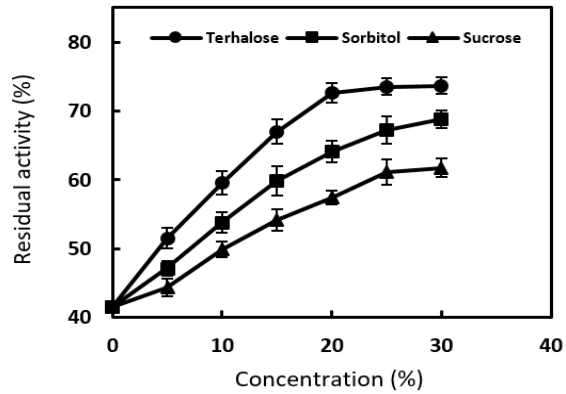
نمودار ۳) پایداری پروتئاز خالص‌شده در حضور غلظت ۵۰% (حجمی/حجمی) از حلال‌های آلی؛ پروتئاز خالص در حضور غلظت ۵۰% حلال‌های آلی به‌مدت ۲ساعت در دمای اتاق انکوبه، سپس فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی در زمان صفر ۱۰۰% در نظر گرفته شد و فعالیت در حضور هر یک از حلال‌های آلی به‌عنوان جزئی از این مقدار محاسبه و گزارش شد.



نمودار ۴) اثر افزودنی‌ها بر فعالیت آنزیمی پروتئاز تخلیص‌شده در حضور حلال‌های آلی؛ برای این منظور فعالیت آنزیمی در غلظت ۵۰% حلال‌های آلی در حضور غلظت ۲۰% ترهالوز، سوربیتول و ساکارز اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت باقی‌مانده آنزیم با درنظرگرفتن فعالیت آنزیم در محیط واکنش بدون افزودنی به‌عنوان کنترل محاسبه شد.

اثر افزودنی‌ها بر پایداری حرارتی: به‌منظور بررسی تاثیر قندها بر پایداری حرارتی پروتئاز، آنزیم به‌مدت ۱۵دقیقه در دمای ۶۵°C در حضور غلظت‌های مختلف قندها انکوبه و فعالیت باقی‌مانده اندازه‌گیری شد (نمودار ۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود آنزیم در دمای ۶۵°C نزدیک به ۶۰% فعالیت خود را از دست می‌دهد اما در حضور قندها فعالیت تا حدود ۷۳% حفظ می‌شود. بیشترین اثر حفظ فعالیت آنزیم مربوط به ترهالوز و بعد از آن به‌ترتیب سوربیتول و ساکارز است (نمودار ۵).

آنزیم همچنین در دمای ۶۵°C با فواصل زمانی مختلف در حضور غلظت ۲۰% قندها انکوبه شد. همان‌طور که در نمودار ۶ مشاهده می‌شود در عدم حضور قند، آنزیم بعد از گذشت ۶۰دقیقه به‌طور کامل فعالیت خود را از دست می‌دهد اما در حضور قندها پایداری حرارتی آنزیم افزایش یافته به‌طوری که در حضور ترهالوز، سوربیتول و ساکارز بعد از ۶۰دقیقه به‌ترتیب بیش از ۵۰، ۴۰ و ۳۷% فعالیت آنزیم حفظ شده است.

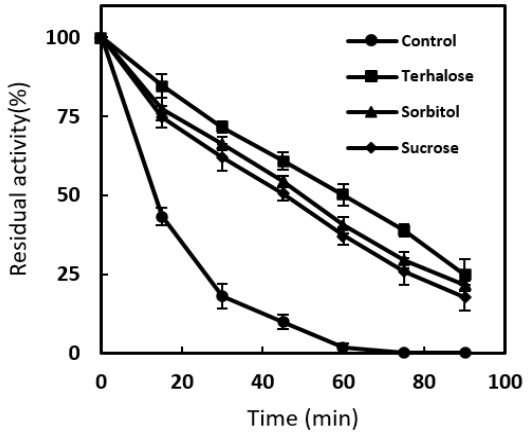


نمودار ۵) اثر غلظت‌های مختلف افزودنی‌ها بر پایداری حرارتی پروتئاز خالص؛ برای این منظور آنزیم به‌مدت ۱۵دقیقه در دمای ۶۵°C در حضور غلظت‌های مختلف (۵ تا ۳۰%) ساکاروز، ترهالوز و سوربیتول انکوبه شد. بعد از آن آنزیم به‌مدت ۳۰دقیقه روی یخ قرار گرفت و فعالیت آنزیمی در دمای ۵۰°C با استفاده از کازئین ۱% اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم در غیاب افزودنی‌ها به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نمودار ۶ غیرفعال‌سازی حرارتی پروتئاز در حضور غلظت ۲۰% افزدونی‌ها را نشان می‌دهد، برای این منظور بعد از انکوباسیون آنزیم در دمای ۶۵°C برای مدت‌زمان ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵ و ۹۰دقیقه، فعالیت باقی‌مانده در دمای ۵۰°C با استفاده از کازئین ۱% اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم حرارت ندیده به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.



نمودار ۶) غیرفعال سازی حرارتی پروتئاز در حضور غلظت ۲۰% افزدونی‌ها؛ برای این منظور بعد از انکوباسیون آنزیم در دمای ۶۵°C برای مدت‌زمان ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵ و ۹۰دقیقه، فعالیت باقی‌مانده در دمای ۵۰°C با استفاده از کازئین ۱% اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم حرارت ندیده به نوان کنترل در نظر گرفته شد.

افزودن قندها به محلول‌های آبی میانکنش‌های هیدروفوبیک بین آمینواسیدهای غیرقطبی را تقویت و منجر به سخت‌ترشدن ساختار پروتئین‌ها و در نتیجه افزایش پایداری آنها می‌شود. همچنین اثر پایدارکنندگی این ترکیبات به تاثیر مثبت آنها بر فعالیت آب محیط نسبت داده شده است[38]. طبق برخی نظریه‌ها اثر محافظتی قندها در برابر ناپایداری پروتئین‌ها در هنگام اضافه‌کردن به محیط، ناشی از تقویت لایه آب‌پوشی اطراف پروتئین‌ها است. قندها وقتی در محیط پروتئین‌ها قرار می‌گیرند موجب منظم‌ترشدن مولکول‌های آب اطراف پروتئین می‌شوند. این مواد می‌توانند با مولکول‌های آب اطراف پروتئین پیوند هیدروژنی برقرار کنند. بنابراین پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب از بین رفته و عمدتاً با پیوندهای ایجادشده با قندها جایگزین می‌شوند. به‌علت این پدیده لایه آب‌پوشی روی سطح پروتئین تقویت می‌شود. با افزایش اندازه قندها و قوی‌ترشدن لایه آب‌پوشی اطراف پروتئین، فشردگی و پایداری پروتئین بیشتر می‌شود[39-41]. همچنین اسمولیت‌ها با پیش‌بردن تعادل فرآیند دناتوراسیون به سمت تاخوردگی طبیعی موجب پایداری پروتئین‌ها می‌شوند[38]. *پاژنگ* و همکاران با بررسی اثر افزودنی‌ها بر پایداری آنزیم اوریکاز نشان دادند آنزیم در عدم حضور افزودنی‌ها تا ۴۵% پایداری خود را حفظ کرده است اما در حضور گلوکز، سوربیتول و گلیسرول، فعالیت باقی‌مانده به‌ترتیب به ۱۱۷، ۷۳ و ۹۴% افزایش یافت که نشان‌دهنده اثر مثبت افزودنی‌ها بر پایداری آنزیم اوریکاز است. افزودنی‌ها با افزایش کشش سطحی باعث آب‌پوشی ترجیحی پروتئین‌ها شده و همچنین از طریق جهت‌گیری آمفی‌پاتیک با نقاط آب‌گریز سطح پروتئین‌ها و جلوگیری از میانکنش نقاط آب‌گریز در سطح پروتئین‌ها با یکدیگر و ایجاد تجمعات غیرفعال باعث افزایش پایداری پروتئین‌ها می‌شوند[42]. در مطالعه‌ای دیگر *رنجبر* و همکاران با بررسی اثر ترهالوز و سوربیتول بر فعالیت و ساختار آنزیم لیپاز سودوموناس سپاسیا دریافتند که هر دو قند موجب افزایش پایداری آنزیم می‌شوند، با این حال ترهالوز اثرات پایدارکنندگی بیشتری نسبت به سوربیتول داشت[43].

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم مطالعه تغییرات ساختاری در حضور حلال‌های آلی و اسمولیت‌ها و بررسی ارتباط آن با خصوصیات سینتیکی و پایداری آنزیم به‌دلیل دسترسی‌نداشتن به اسپکتروسکوپی‌های دورنگ‌نمایی دورانی و فلورسانس اشاره کرد. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای مطالعات آتی، بررسی‌های ساختاری در حضور حلال‌های آلی و اسمولیت‌ها صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

ترشحی‌بودن آنزیم مورد مطالعه و میزان کم ناخالصی‌های پروتئینی همراه آن از مزایایی است که در تسهیل و حذف برخی فرایندهای پایین‌دست در بیوتکنولوژی حائز اهمیت است. از طرف دیگر خالص‌سازی یک مرحله‌ای و سریع آنزیم سیستئین‌پروتئاز مورد مطالعه با بازده و کارآیی بالا و مطلوب دستیابی به پروتئین کاملاً خالص را امکان‌پذیر می‌کند. آنزیم‌های طبیعی مقاوم به حلال‌های آلی دارای کاربردهای فراونی در صنایع مختلف هستند. پایداری بالای پروتئاز خالص‌شده نسبت به حلال‌های آلی پتانسیل قابل توجه آن به‌عنوان یک بیوکاتالیست برای کاربردهای صنعتی، خصوصاً سنتز ترکیبات با ارزش دارویی و غذایی در حضور حلال‌های آلی را نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از دانشگاه گیلان برای فراهم‌نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی از این تحقیق کمال تشکر را دارند.

تاییدیه‌اخلاقی: پژوهش حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده است، همچنین نتایج مندرج در این مقاله از صحت و اصالت علمی برخوردار هستند.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مسلم افشارنژاد (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۵%)؛ سیده‌شیرین شاهنگیان (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۵%)؛ محمود صالحی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۱۵%)؛ ریحانه سریری (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۱۵%)

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مالی: پژوهش حاضر تحت حمایت مالی دانشگاه گیلان بوده است.

منابع

1- Simon LM, Kotormán M, Szabó A, Nemcsók J, Laczkó I. The effects of organic solvent/water mixtures on the structure and catalytic activity of porcine pepsin. Process Biochem. 2007;42(5):909-12.
2- Davis BG, Boyer V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. Nat Prod Rep. 2001;18(6):618-40.
3- Doukyu N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem Eng J. 2010;48(3):270-82.
4- Miroliaei M, Nemat-Gorgani M. Effect of organic solvents on stability and activity of two related alcohol dehydrogenases: A comparative study. Int J Biochem Cell Biol. 2002;34(2):169-75.
5- Griebenow K, Klibanov AM. On protein denaturation in aqueous- organic mixtures but not in pure organic solvents. J Am Chem Soc. 1996;118(47):11695-700.
6- Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. Acs Catal. 2013;3(12):2823-36.
7- Stepankova V, Damborsky J, Chaloupkova R. Organic co-solvents affect activity, stability and enantioselectivity of haloalkane dehalogenases. Biotechnol J. 2013;8(6):719-29.
8- Arakawa T, Timasheff SN. Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry. 1982;21(25):6536-44.
9- Back JF, Oakenfull D, Smith MB. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. Biochemistry. 1979;18(23):5191-6.
10- Kumar V, Chari R, Sharma VK, Kalonia DS. Modulation of the thermodynamic stability of proteins by polyols: Significance of polyol hydrophobicity and impact on the chemical potential of water. Int J Pharm. 2011;413(1-2):19-28.
11- Street TO, Bolen DW, Rose GD. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(38):13997-4002.
12- Cioni P, Bramanti E, Strambini GB. Effects of sucrose on the internal dynamics of azurin. Biophys J. 2005;88(6):4213-22.
13- Schaller A. A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. Planta. 2004;220(2):183-97.
14- Tomar R, Kumar R, Jagannadham MV. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant Wrightia tinctoria (Roxb.) R. Br.: Purification and biochemical properties. J Agric Food Chem. 2008;56(4):1479-87.
15- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(3):597-635.
16- Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnol Adv. 1999;17(7):561-94.
17- Afsharnezhad M, Shahangian SS, Sariri R. A novel milk-clotting cysteine protease from Ficus johannis: Purification and characterization. Int J Biol Macromol. 2019;121:173-82.
18- Kumari M, Sharma A, Jagannadham MV. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from Ficus religiosa. Food Chem. 2012;131(4):1295-303.
19- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
20- Omrane Benmrad M, Moujehed E, Ben Elhoul M, Zaraî Jaouadi N, Mechri S, Rekik H, et al. A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from Trametes cingulata strain CTM10101. Int J Biol Macromol. 2016;91:961-72.
21- Hadjidj R, Badis A, Mechri S, Eddouaouda K, Khelouia L, Annane R, et al. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from Bacillus licheniformis strain K7A. Int J Biol Macromol. 2018;114:1033-48.
22- Pazhang M, Khajeh K, Ranjbar B, Hosseinkhani S. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. J Biotechnol. 2006;127(1):45-53.
23- Devaraj KB, Kumar PR, Prakash V. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from Ficus carica. J Agric Food Chem. 2008;56(23):11417-23.
24- Anbu P. Characterization of solvent stable extracellular protease from Bacillus koreensis (BK-P21A). Int J Biol Macromol. 2013;56:162-8.
25- Shan SO, Herschlag D. The change in hydrogen bond strength accompanying charge rearrangement: Implications for enzymatic catalysis. Proc Natl Acad Sci. 1996;93(25):14474-9.
26- Wan YY, Lu R, Xiao L, Du YM, Miyakoshi T, Chen CL, et al. Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from Rhus vernicifera. Int J Biol Macromol. 2010;47(4):488-95.
27- Zaks A, Klibanov AM. The effect of water on enzyme action in organic media. J Biol Chem. 1988;263(17):8017-21.
28- Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. Protein Eng Des Sel. 2000;13(3):179-91.
29- Gorman LA, Dordick JS. Organic solvents strip water off enzymes. Biotechnol Bioeng. 1992;39(4):392-7.
30- Ghorbel B, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Stability studies of protease from Bacillus cereus BG1. Enzym Microb Technol. 2003;32(5):513-8.
31- Geok LP, Abdul Razak CN, Abd Rahman RNZ, Basri M, Salleh AB. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. Biochem Eng J. 2003;13(1):73-7.
32- Ghatorae AS, Bell G, Halling PJ. Inactivation of enzymes by organic solvents: New technique with well-defined interfacial area. Biotechnol Bioeng. 1994;43(4):331-6.
33- Sadr-e-Momtaz A, Ebrahimi S, Rahmani H, Asghari SM, Aghamaali MR, Sajadi RH. Evaluation of protease stability from Pseudomonas aeroginosa strain PTCC1430 in organic solvents. New Cell Mol Biotechnol J. 2013;3(9):85-89. [Persian]
34- Ogino H, Watanabe F, Yamada M, Nakagawa S, Hirose T, Noguchi A, et al. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant Pseudomonas aeruginosa PST-01. J Biosci Bioeng. 1999;87(1):61-8.
35- Alsafadi D, Paradisi F. Effect of organic solvents on the activity and stability of halophilic alcohol dehydrogenase (ADH2) from Haloferax volcanii. Extremophiles. 2013;17(1):115-22.
36- Ogino H, Uchiho T, Doukyu N, Yasuda M, Ishimi K, Ishikawa H. Effect of exchange of amino acid residues of the surface region of the PST-01 protease on its organic solvent-stability. Biochem Biophys Res Commun. 2007;358(4):1028-33.

www.SID.ir

Archive of SID

41- Zaroog MS, Abdul Kadir H, Tayyab S. Stabilizing effect of various polyols on the native and the denatured states of glucoamylase. Sci World J. 2013;2013:570859.
42- Mirzaei Nia S, Pazhang M, Imani M. Study of the stability of uricase from Aspergillus flavus and its stabilization by glucose. Modares J Biotechnol. 2017;8(1):50-60. [Persian]
43- Azizi A, Ranjbar B, Khajeh K, Ghodselahi T, Hoornam S. Comparative investigation of individual and combinational effects of trehalose & sorbitol on the activity and structure of Pseudomonas cepacia lipase. Modares J Biotechnol. 2013;3(2):21-31. [Persian]
37- Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63(13):1053-73.
38- Iyer PV, Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization-aqueous and non-aqueous environment. Process Biochem. 2008;43(10):1019-32.
39- Kumar A, Attri P, Venkatesu P. Effect of polyols on the native structure of α-chymotrypsin: A comparable study. Thermochim Acta. 2012;536:55-62.
40- Silva C, Martins M, Jing S, Fu J, Cavaco-Paulo A. Practical insights on enzyme stabilization. Crit Rev Biotechnol. 2018;38(3):335-50.

www.SID.ir